·论著·

基于孟德尔随机化探讨肠道菌群与失眠的因果关联研究

郭玉梦[1]，崔杨霖[1]，张宪忠[2*]

1.250014 山东省济南市，山东中医药大学
2.276800 山东省日照市中医医院中医经典科
*通信作者：张宪忠，主任医师；E-mail：rzzxz@163.com

【摘要】 **背景** 随着失眠的发病率逐渐升高，其严重影响患者的精神及工作状态。肠道菌群被认为是失眠的一个危险因素，但目前存在相关证据较为缺乏的问题，难以准确认识二者之间的关系。**目的** 使用两样本孟德尔随机化作为研究方法，探索肠道菌群与失眠之间的因果关系。**方法** 使用 MiBioGen 联盟进行的最大可用全基因组关联研究荟萃分析（n=18 340）中肠道菌群的汇总统计数据，根据预设的阈值提取与 196 种肠道微生物相对丰度显著相关的单核苷酸多态性（SNP）作为工具变量（IVs）。失眠的汇总统计数据来自英国生物样本库（UK Biobank）（n=462 341）。采用逆方差加权法（IVW）、MR-Egger 回归、加权中位数法（WME）、加权众数法（WM）等检测肠道菌群与失眠之间的因果关系，其中以 IVW 法为主，根据效应指标优势比（OR）和 95% 置信区间（CI）评估结果。结合敏感性分析、异质性检验、基因多效性检验和异常值检验（MR-PRESSO）等方法来验证结果的稳定性和可靠性。并对发现与失眠有因果关系的菌群进行反向孟德尔随机化分析。**结果** IVW 结果显示蔷薇菌属（genus_Roseburia）（OR=0.787，95%CI：0.671-0.923，P_{FDR}=0.016）、丹毒杆菌属（genus_Erysipelatoclostridium）（OR=0.880，95%CI：0.794-0.976，P_{FDR}=0.077）、副普雷沃氏菌属（genus_Paraprevotella）（OR=0.891，95%CI：0.801-0.991，P_{FDR}=0.083）、瘤胃球菌属 UCG014 组（genus_Ruminococcaceae UCG014）（OR=0.818，95%CI：0.697-0.961，P_{FDR}=0.072）、巴斯德菌科（family_Pasteurellaceae）（OR=0.897，95%CI：0.814-0.988，P_{FDR}=0.081）、巴斯德菌目（order_Pasteurellales）（OR=0.897，95%CI：0.814-0.988，P_{FDR}=0.094）和失眠有关，未发现 IVs 存在基因多效性或显著异质性。根据反向孟德尔随机化分析结果，失眠对肠道菌群无显著的因果影响。**结论** 蔷薇菌属、丹毒杆菌属、副普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属 UCG014 组、巴斯德菌科、巴斯德菌目 6 种肠道菌群丰度与失眠的发病风险呈负相关，即丰度降低会增加失眠的发病风险，为失眠的保护因素。

【关键词】 肠道菌群；失眠；孟德尔随机化；因果关联
【中图分类号】 R 741　R 378.2　【文献标识码】 A　DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0656

Based on Mendelian Randomization to Explore the Causal Relationship with Insomnia and Gut Microbiota

GUO Yumeng[1]，*CUI Yanglin*[1]，*ZHANG Xianzhong*[2*]
1.Shandong University of Traditional Chinese Medicine，Jinan 250355，China
2.Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine，Rizhao 276800，China
**Corresponding author：ZHANG Xianzhong，Chief physician；E-mail：rzzxz@163.com*

【Abstract】 **Background** As the prevalence of insomnia is gradually increasing，it is seriously affecting the mental and work status of patients. The gut microbiota is considered to be a risk factor for insomnia，but there is a relative lack of evidence to accurately recognize the relationship between gut microbiota and insomnia. **Objective** Using two-sample Mendelian randomization as a research methodology to explore the causal relationship between gut microbiota and insomnia. **Methods**

基金项目：第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目（国中医人教函〔2022〕76 号）；日照市重点研发计划项目（公益性科技攻关）（2021ZDYF020213）

引用本文：郭玉梦，崔杨霖，张宪忠. 基于孟德尔随机化探讨肠道菌群与失眠的因果关联研究［J］. 中国全科医学，2024. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0656.［Epub ahead of print］［www.chinagp.net］

GUO Y M，CUI Y L，ZHANG X Z. Based on Mendelian randomization to explore the causal relationship with insomnia and gut microbiota［J］. Chinese General Practice，2024.［Epub ahead of print］.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with the relative abundance of 196 gut microorganisms were extracted as instrumental variables (IVs) according to predefined thresholds using pooled statistics of the gut microbiota from the largest available genome-wide meta-analysis of association studies conducted by the MiBioGen consortium (n=18 340). Pooled statistics for insomnia were obtained from the UK Biobank (n=462 341). Inverse variance weighting (IVW), MR-Egger regression, weighted median (WME), and weighted multinomial (WM) were used to detect the causal relationship between gut microbiota and insomnia, with IVW being the predominant method, and the results were assessed according to the effect indicator dominance ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). Sensitivity analysis, heterogeneity test, gene multiplicity test, MR multiplicity residual and outlier test (MR-PRESSO) were combined to verify the stability and reliability of the results. Reverse Mendelian randomization analysis was also performed on the colonies found to be causally associated with insomnia. **Results** IVW results showed that genus_Roseburia (OR=0.787, 95%CI=0.671-0.923, P_{FDR}=0.016), genus_Erysipelatoclostridium (OR=0.880, 95%CI=0.794-0.976, P_{FDR}=0.077), genus_Paraprevotella (OR=0.891, 95%CI=0.801-0.991, P_{FDR}=0.083), genus_Ruminococcaceae UCG014 group (OR= 0.818, 95%CI=0.697-0.961, P_{FDR}=0.072), family_Pasteurellaceae (OR=0.897, 95%CI=0.814-0.988, P_{FDR}=0.081), order_Pasteurellales (OR=0.897, 95%CI=0.814-0.988, P_{FDR}=0.094) were associated with insomnia, and no genetic pleiotropy or significant heterogeneity of IVs was found. According to the results of reverse MR analysis, insomnia had no significant causal effect on gut microbiota. **Conclusion** The abundance of six species of GM from the genus_Roseburia, genus_Erysipelatoclostridium, genus_Paraprevotella, genus_Ruminococcaceae UCG014 group, family_Pasteurellaceae, and order_Pasteurellales is negatively correlated with the risk of developing insomnia, i.e., decreased abundance increased the risk of developing insomnia and is a protective factor against insomnia.

【Key words】 Intestinal flora; Insomnia; Mendelian randomization; Causal correlation

失眠是一种常见的临床疾病，其特征是难以入睡，或夜间易醒[1]。10%~20% 的患者有失眠，其中 50% 为慢性进展。据估计，全世界约有 1/5 的人患有失眠[2]。肠道菌群（gut microbiota，GM）是一个动态而复杂的生态细菌群落[3]，近年来，越来越多的证据表明，GM 的失衡与失眠密切相关，维持平衡的肠道微生物种群在失眠调节中起着重要作用[4]。既往研究指出，肠道细菌可以通过脑－肠道－微生物群（brain-gut-microbiot axis，BGM）轴，影响人体的神经、免疫、代谢和内分泌系统，进而导致睡眠异常[5]，如 PETRA 等[6]证实，肠道菌群能够调节神经活性分子的合成，例如乙酰胆碱、儿茶酚胺、γ－氨基丁酸、组胺、褪黑激素和血清素等，这些物质对于获得正常睡眠起到重要作用。亦有研究表明，失眠患者 GM 的组成和结构与健康人群有明显不同[7]。但是，与失眠相关的肠道微生物群和血清代谢物在很大程度上仍然未知。

孟德尔随机化（Mendelian randomization，MR）是一种利用遗传变异构建暴露的工具变量（Instrumental variables，IVs），以估计暴露与结局疾病之间的因果关系的方法[8]。由于基因型从父母到后代的分配是随机的，故可视为随机对照试验（randomized controlled trials，RCT）的一种替代方法[9]，且遗传变异与结局之间的关联不受常见混杂因素的影响，因果序列是合理的[10]。目前 MR 已被广泛用于探索 GM 与疾病间的因果关系，包括代谢性疾病[11]、自身免疫性疾病[12]等。本研究使用来自 MiBioGen 和 UK Biobank 的全基因组关联研究（Genome Wide Association Study，GWAS）汇总统计数据，进行两样本孟德尔随机化（Two-sample Mendelian randomization，TSMR）分析，以评估 GM 与失眠之间的因果关系，并找寻与本病相关的肠道微生物。

1 资料与方法

1.1 研究设计

本研究采用 TSMR 的方法，以 GM 作为暴露，失眠作为结局，探究 GM 与失眠间的因果关联，主要以逆方差加权法（inverse-variance weighted，IVW）方法为主，然后进行敏感性分析、异质性检验、基因多效性检验以及异常值检验（MR pleiotropy residual sum and outlier，MR-PRESSO）等方法来验证结果的可靠性。

MR 分析需满足以下 3 个假设：（1）IVs 与暴露需有较强的关联（关联性假设）；（2）IVs 不应通过混杂因素与结果相关（独立性假设）；（3）IVs 不能直接影响结局，而只能通过暴露（排他性假设），见图 1。

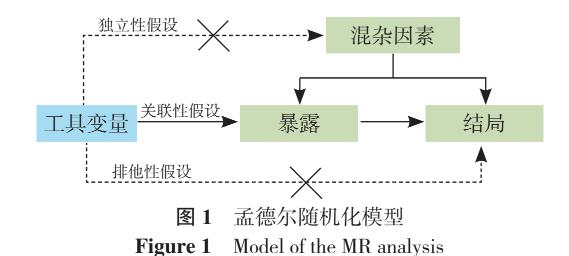


图 1 孟德尔随机化模型
Figure 1 Model of the MR analysis

1.2 数据来源

选取 GM 相关单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNPs）作为暴露的 IVs。这些 SNPs 的

汇总数据来自 MiBioGen 联盟，该联盟分析了 18 340 名不同种族和国籍的参与者的 16S rRNA 基因测序数据（72.3% 的人口是欧洲人，其余包括来自中东、东亚、美国西班牙裔 / 拉丁裔和非裔美国人）[13]；失眠的遗传数据来自 UK Biobank，通过 IEU OpenGWAS project（https://gwas.mrcieu.ac.uk/）访问该数据（GWAS ID：ukb-b-3957），样本包括 462 341 名健康欧洲参与者，共有 9 851 867 个 SNPs。

1.3　工具变量的选择

211 种肠道微生物剔除 15 种未知菌属后，本研究共纳入 196 种肠道微生物，采用以下标准筛选 IVs：（1）在基因位点范围内显著性阈值（$P<1.0\times10^{-5}$）的 SNPs 被选作潜在的 IVs[11]；（2）连锁不平衡阈值设置为 $r^2<0.001$；（3）聚集窗口大小设置为 10 000 kb，以确保纳入的 SNPs 之间相互独立。最后，从结局变量中提取上述选定的 SNPs 数据。

为排除弱工具变量偏差对关联效应估计的影响，使用 F 值来检验工具变量的强度，计算公式如下：$F=\beta^2/SE^2$[14]，β 为效应值，SE 为标准误，若 $F>10$，则认为没有显著的弱工具偏倚[15]。

1.4　统计学方法

使用 R（版本 4.3.1）中的 TwoSampleMR 软件包（版本 0.5.7）、MR-PRESSO 软件包（版本 1.0）进行统计学分析。

本研究主要采用 IVW 进行分析，计算 OR 值和 95%*CI*，评估肠道微生物丰度与失眠发生风险的潜在因果关联，结合 MR-Egger 回归、加权中位数法（Weighted median，WME）、加权众数法（Weighted mode，WM）作为 IVW 的补充方法。当 IVW 方法的 $P<0.05$，且 MR-Egger 回归，WME 和 WM 方向相同时，即考虑为相对稳定的因果关联[9]。

此外，分析 MR-Egger 截距项（Egger-intercept）可识别水平多效性，若 Egger-intercept 无限接近 0 或无统计学意义时，表明不存在基因多效性[16]，本研究还采用了 MR-PRESSO 方法，该方法可以检测可能的异常值，并在剔除离群值（$P<0.05$）后重新进行因果分析[17]。使用留一法（leave-one-out）进行敏感性分析，通过依次删除单个 SNP 计算剩余 SNPs 的合并效应值，以此判断每个 SNP 对因果关系的影响[18]。为了测量异质性的程度，应用 Cochran Q 检验，IVW Q 统计量用于量化 IVs 的异质性，评估 IVs 之间是否存在潜在的异质性，$P<0.05$ 提示存在显著异质性。

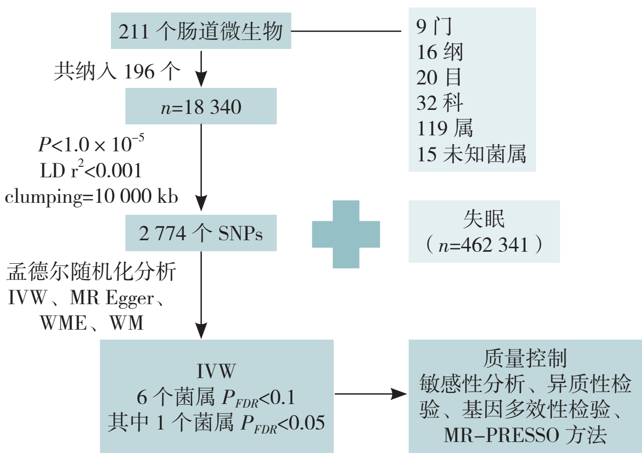
为了避免结果因多重检验出现假阳性，故进行错误发现率（FDR）校正，以 $P_{FDR}<0.1$ 为具有统计学意义[10, 19]。当 $P<0.05$ 但 $P_{FDR}\geq0.1$ 时，肠道菌群属和失眠被认为具有潜在关联。

为了评估 GM 与失眠之间的因果关系，本研究还对在正向 MR 分析中发现与失眠有因果关系的细菌进行了反向 MR 分析，采用的方法和设置与正向一致。

2　结果

2.1　工具变量

去除 15 个未知菌属，本研究共纳入 196 种肠道微生物，包括 9 门、16 纲、20 目、32 科、119 属，根据标准筛选后得到 2 774 个与肠道菌群相关的 SNPs。其中 F 值均 >10，消除了弱工具变量产生的偏倚。分析流程见图 2。



注：SNPs= 单核苷酸多态性，IVW= 逆方差加权法，WME= 加权中位数法，WM= 加权众数法。

图 2　孟德尔随机化分析流程图

Figure 2　Flow chart of MR analysis

2.2　MR 分析

本研究采用 4 种 TSMR 方法，其中以 IVW 方法为主，并用 FDR 方法校正分析结果，详见表 1。IVW 结果显示，6 种肠道微生物与失眠存在因果关联（$P_{FDR}<0.1$），在属水平上，蔷薇菌属（*OR*=0.787，95%*CI*=0.671-0.923，P_{FDR}=0.016）、丹毒杆菌属（*OR*=0.880，95%*CI*=0.794-0.976，P_{FDR}=0.077）、副普雷沃菌属（*OR*=0.891，95%*CI*=0.801-0.991，P_{FDR}=0.083）、瘤胃球菌属 UCG014 组（*OR*=0.818，95%*CI*=0.697-0.961，P_{FDR}=0.072）与失眠风险呈负相关；另外还发现巴斯德菌科（*OR*=0.897，95%*CI*=0.814-0.988，P_{FDR}=0.081）、巴斯德菌目（*OR*=0.897，95%*CI*=0.814-0.988，P_{FDR}=0.094）这两种肠道微生物丰度增加，也会降低失眠的发病风险。如图 3 所示，4 种 TSMR 方法的效应值方向一致，故认为以上 6 种肠道细菌类群为失眠的保护因素。此外拟杆菌类（class Bacteroidia）、肠道杆菌属（genus Intestinibacter）、瘤胃球菌属 UCG003 组（genus Ruminococcaceae UCG003）、拟杆菌目（order Bacteroidales）、脱硫弧

菌目（order Desulfovibrionales）、广古菌门（phylum Euryarchaeota）、黏胶球形菌门（phylum Lentisphaerae）与失眠的 IVW 分析 P 值亦小于 0.05，但在 FDR 校正后不再显著（P_{FDR}>0.1），故提示上述 7 类肠道微生物与失眠具有潜在性关联。

2.3 质量控制

留一法分析显示，当逐个去除 SNP 时，剩余 SNPs 的合并效应与总效应之间无实质性差异，具体见图 4。如表 2 所示，MR-PRESSO 分析结果亦显示不存在离群值（*P*>0.05），进一步验证了结果的可靠性。另外 Cochran Q 检验、Egger-intercep*t* 检验结果 P 值均 >0.05，表明本研究的 IVs 没有显著的异质性，结果不受基因多效性的影响。

2.4 反向 MR 分析

通过对正向 MR 分析中与失眠存在显著或潜在因果关系的 13 个肠道微生物群（2 个门、1 个纲、3 个目、1 个科、6 个属）进行反向 MR 分析。没有发现失眠与上述肠道菌群具有显著因果关联（*P*>0.05）。

3 讨论

本研究使用 MiBioGen 和 UK Biobank 的 GWAS 汇总数据，经过 TSMR 分析，发现蔷薇菌属、丹毒杆菌属、副普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属 UCG014 组、巴斯德菌科、巴斯德菌目相对丰度与失眠的发生风险呈负相关。

近年来有研究认为 GM 与失眠具有一定相关性，如 CHOI 等[20]发现肠道菌群所表现出昼夜节律，与宿主昼夜节律存在相互作用，TEICHMAN 等[21]证实肠道菌群衍生物短链脂肪酸（SCFAs）（主要是乙酸、丙酸和丁酸）可改变昼夜节律，并影响时钟基因的表达，可见 GM 与睡眠时间节律存在联系。有学者提出脑－肠道－微生物群（BGM）轴是肠道细菌参与失眠发病的重要途径[5]，因 BGM 轴是一个复杂的双向通信系统，其主要由神经、免疫、代谢和内分泌途径组成，能紧密连接肠道和大脑，故炎性因子、肠道代谢产物、激素、神经递质、迷走神经皆可经此影响睡眠[22]。关于肠道菌群经由 BGM 轴与失眠发病相关的机制有以下 5 种说法：（1）下丘脑－垂体－肾上腺（HPA）轴：有研究发现，某些

表 1 与失眠有因果关系的肠道微生物对应的 4 种 TSMR 方法的效应值

Table 1 Effect sizes of four TSMR methods corresponding to gut microbiota with a causal relationship to insomnia

暴露	SNP（个）	方法	β	*OR*	*95%CI*	*P* 值	P_{FDR}
蔷薇菌属	11	IVW	−0.240	0.787	0.671~0.923	0.003	0.016
		MR Egger	−0.551	0.576	0.305~1.089	0.124	0.155
		WME	−0.293	0.746	0.601~0.926	0.008	0.020
		WM	−0.358	0.699	0.526~0.929	0.033	0.056
巴斯德菌科	9	IVW	−0.109	0.897	0.814~0.988	0.027	0.081
		MR Egger	−0.180	0.835	0.648~1.078	0.209	0.209
		WME	−0.137	0.872	0.769~0.989	0.032	0.081
		WM	−0.141	0.869	0.751~1.006	0.096	0.160
丹毒杆菌属	13	IVW	−0.128	0.880	0.794~0.976	0.015	0.077
		MR Egger	−0.407	0.666	0.443~1.002	0.077	0.139
		WME	−0.111	0.895	0.785~1.020	0.095	0.139
		WM	−0.155	0.856	0.717~1.022	0.111	0.139
副普雷沃菌属	12	IVW	−0.116	0.891	0.801~0.991	0.033	0.083
		MR Egger	−0.555	0.574	0.319~1.034	0.094	0.157
		WME	−0.168	0.845	0.729~0.980	0.026	0.083
		WM	−0.168	0.845	0.683~1.046	0.150	0.166
瘤胃球菌属 UCG014 组	10	IVW	−0.200	0.818	0.697~0.961	0.014	0.072
		MR Egger	−0.045	0.956	0.584~1.565	0.863	0.863
		WME	−0.153	0.859	0.719~1.025	0.091	0.198
		WM	−0.125	0.883	0.730~1.067	0.230	0.287
巴斯德菌目	9	IVW	−0.109	0.897	0.814~0.988	0.027	0.094
		MR Egger	−0.180	0.835	0.648~1.078	0.209	0.209
		WME	−0.137	0.872	0.766~0.992	0.037	0.094
		WM	−0.141	0.869	0.754~1.000	0.087	0.144

注：SNPs= 单核苷酸多态性，IVW= 逆方差加权法，WME= 加权中位数法，WM= 加权众数法。

注：A 为蔷薇菌属，B 为巴斯德菌科，C 为丹毒杆菌属，D 为副普雷沃氏菌属，E 为瘤胃球菌属 UCG014 组，F 为巴斯德菌目。

图 3 与失眠具有因果关系的肠道微生物的 4 种 MR 模型散点图

Figure 3 Scatter plots of four MR models for gut microbiota with a causal association to insomnia

表 2 与失眠存在因果关系的肠道微生物的质量控制结果

Table 2 Quality control results of GM with causal relationship with insomnia

暴露	异质性检验			基因多效性检验		MR-PRESSO	
	方法	Q	P 值	Egger-intercept	P 值	global.test	P 值
蔷薇菌属	IVW	4.259	0.935	0.0226	0.348	5.750	0.918
巴斯德菌科	IVW	7.389	0.495	0.009	0.573	8.600	0.613
丹毒杆菌属	IVW	5.410	0.943	0.024	0.194	6.323	0.947
副普雷沃菌属	IVW	11.292	0.419	0.044	0.168	13.695	0.435
瘤胃球菌属 UCG014 组	IVW	16.924	0.050	-0.014	0.529	20.021	0.111
巴斯德菌目	IVW	7.389	0.495	0.009	0.573	8.600	0.595

肠道益生菌可以调控 HPA 轴相关的应激反应[23]，而 HPA 轴活跃会改变肠道通透性并释放更多的皮质醇[24]，经此可产生更多影响睡眠的炎症因子，进而导致睡眠时间变浅，夜间觉醒增加[25]；（2）神经递质：失眠与神经递质密切相关，例如 γ-氨基丁酸（GABA）和五羟色胺（5-HT）两者均有正向调节睡眠的作用，研究发现乳酸杆菌和双歧杆菌等益生菌能够产生 GABA 和促进 5-HT 的转化，表明肠道菌群可以通过调控神经递质从而影响睡眠[26-27]；（3）免疫系统：IMERI 等[28]研究发现，中枢神经系统（CNS）中白介素 1β（IL-1β）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）发出信号传导可调节睡眠-觉醒行为，一项临床研究亦表明，慢性失眠患者的 IL-1β 水平显著升高，说明失眠与炎症有一定联系。肠道菌群失调可损伤肠道屏障，介导人体炎症反应，进而影响 CNS 导致失眠[29]；（4）代谢产物：有证据显示，肠道菌群产生的代谢物是促进睡眠信号的重要来源，尤其是 SCFA，该物质在肠道菌群食物发酵过程中产生，其作用可以减轻炎症，增强肠道屏障[5, 30]，是一个潜在诱导睡眠的信号分子，若肠道菌群失调而使 SCFA 产生减少，可增加失眠风险；（5）迷走神经：连接大脑和肠道菌群的主要信号通路之一是迷走神经[31]，有研究发现益生菌可通过增加小鼠中枢 γ-氨基丁酸



注：A 为蔷薇菌属，B 为巴斯德菌科，C 为丹毒杆菌属，D 为副普雷沃氏菌属，E 为瘤胃球菌属 UCG014 组，F 为巴斯德菌目。

图 4 与失眠具有因果关系的肠道微生物 leave-one-out 图

Figure 4 Leave-one-out plot for gut microbiota with a causal relationship to insomnia

（GABA）受体的表达来调节睡眠[32]。

既往临床研究亦显示，失眠患者 GM 的组成和多样性显著改变，如 XU 等[7]通过对失眠个体和健康个体中肠道菌群相对丰度的比较，发现失眠患者的厚壁菌与拟杆菌比例显著降低，且拟杆菌是失眠组中的主要分类群。ZHOU 等[33]发现失眠患者的拟杆菌科、瘤胃球菌科和拟杆菌属显著减少，而普雷沃氏菌科和普雷沃氏菌属显著增加。上述研究表明 GM 可能与失眠存在相关性，但失调的菌群种类没有统一，研究结论尚存在一定争议。

本研究发现蔷薇菌属（P_{FDR}<0.05）、丹毒杆菌属、副普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属 UCG014 组、巴斯德菌科、巴斯德菌目等 6 类肠道菌群丰度失调与失眠有显著相关性，且 6 类菌群的 OR 值均 <1，故皆为失眠的保护性因素，其中尤以蔷薇菌属最为重要，该菌属由专性革兰阳性厌氧菌组成，能够产生一种抗炎 SCFA——丁酸盐，有研究显示丁酸盐可显著促进大鼠和小鼠的非快速眼动睡眠，故被认为是诱导睡眠潜在的信号分子[34-35]。若蔷薇菌属丰度降低，可能通过影响丁酸盐的产生进而导致睡眠异常。瘤胃球菌属是消化球菌科（Peptoeaccaeeae）的革兰阳性厌氧细菌属，既往研究发现瘤胃球菌科在失眠患者体内亦明显减少[33]。副普雷沃氏菌属是 2009 年建立的属分类学，在系统发育和表型上与普雷沃氏菌属（Prevotella）最相似[36]，但两物种基因组中亦存在 48 个不同的分泌肽酶家族[37]，既往研究发现失眠人群肠道中的普雷沃氏菌属丰度增加[33]，但本研究认为副普雷沃氏菌属是失眠的保护性因素，说明两菌属虽有相似性，但导致失眠的发病机制可能存在差异。

具有潜在相关性的菌群包括拟杆菌类、肠道杆菌属、瘤胃球菌属 UCG003、拟杆菌目、脱硫弧菌目、广古菌门、黏胶球形菌门，此类菌群 P<0.05，但 P_{FDR}>0.1，故被认为具有暗示性关联。在既往研究中，ZHANG 等[38]发现肠道杆菌属在并发睡眠障碍的重度抑郁症（major depressive disorders，MDD）患者中显著减少。ANDERSON 等[39]调查了 64 名老年人肠道菌群与睡眠质量的关系，发现高质量的睡眠与的高比例黏胶球形菌门有关。

本研究的优势是利用 MR 方法得出 GM 与失眠之间的因果关系，可为后续研究提供候选的肠道微生物；

且本研究样本量较大，可较大程度避免混杂因素的干扰；此外利用 MR-PRESSO 和 MR-Egger 截距试验以检测和排除基因多效性。局限性方面，首先由于暴露数据中最低的分类水平是属，这导致无法在物种水平上进一步探索 GM 与失眠之间的因果关系。其次为了进行敏感性分析和水平多效性检测，需要将更多的遗传变异作为 IVs，这样导致 MR 分析中所用的 SNPs 未达到传统的 GWAS 显著性阈值（$P<5\times10^{-8}$），因此又用 FDR 校正来限制误报的可能性。另外本研究纳入的数据来源于欧洲人群，研究结果与亚洲人群可能有所差别，因此后续可在亚洲人群中进一步研究 GM 与失眠发生的相关性。

综上所述，本研究通过孟德尔随机化分析发现蔷薇菌属、丹毒杆菌属、副普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属 UCG014 组、巴斯德菌科、巴斯德菌目与失眠有因果关系，此 6 类肠道微生物相对丰度增加，可降低失眠发病风险，为失眠的诊治提供新的思路，但仍需进一步的大样本 RCT，以阐明相关菌群对失眠的保护作用及机制。

作者贡献：郭玉梦、张宪忠提出研究思路；崔杨霖设计研究方案；崔杨霖负责数据收集、采集、清洗；郭玉梦负责统计学分析、绘制图表；郭玉梦、崔杨霖负责论文起草；郭玉梦、张宪忠负责最终版本修订，对论文负责。

本文无利益冲突。

参考文献

［1］DALEY M，MORIN C M，LEBLANC M，et al. The economic burden of insomnia：direct and indirect costs for individuals with insomnia syndrome，insomnia symptoms，and good sleepers［J］. Sleep，2009，32（1）：55-64.

［2］LI L Q，GAN Y，ZHOU X G，et al. Insomnia and the risk of hypertension：a meta-analysis of prospective cohort studies［J］. Sleep Med Rev，2021，56：101403. DOI：10.1016/j.smrv.2020.101403.

［3］O'HARA A M，SHANAHAN F. The gut flora as a forgotten organ［J］. EMBO Rep，2006，7（7）：688-693. DOI：10.1038/sj.embor.7400731.

［4］REYNOLDS A C，PATERSON J L，FERGUSON S A，et al. The shift work and health research agenda：considering changes in gut microbiota as a pathway linking shift work，sleep loss and circadian misalignment，and metabolic disease［J］. Sleep Med Rev，2017，34：3-9. DOI：10.1016/j.smrv.2016.06.009.

［5］FENG W Y，YANG Z H，LIU Y X，et al. Gut microbiota：a new target of traditional Chinese medicine for insomnia［J］. Biomedecine Pharmacother，2023，160：114344. DOI：10.1016/j.biopha.2023.114344.

［6］PETRA A I，PANAGIOTIDOU S，HATZIAGELAKI E，et al. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation［J］. Clin Ther，2015，37（5）：984-995. DOI：10.1016/j.clinthera.2015.04.002.

［7］XU J，CHEN H B，LI S L. Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota［J］. Med Res Rev，2017，37（5）：1140-1185. DOI：10.1002/med.21431.

［8］GREENLAND S. An introduction to instrumental variables for epidemiologists［J］. Int J Epidemiol，2000，29（4）：722-729. DOI：10.1093/ije/29.4.722.

［9］ZHANG L L，ZI L L，KUANG T R，et al. Investigating causal associations among gut microbiota，metabolites，and liver diseases：a Mendelian randomization study［J］. Front Endocrinol，2023，14：1159148. DOI：10.3389/fendo.2023.1159148.

［10］LI P S，WANG H Y，GUO L，et al. Association between gut microbiota and preeclampsia-eclampsia：a two-sample Mendelian randomization study［J］. BMC Med，2022，20（1）：443. DOI：10.1186/s12916-022-02657-x.

［11］SANNA S，VAN ZUYDAM N R，MAHAJAN A，et al. Causal relationships among the gut microbiome，short-chain fatty acids and metabolic diseases［J］. Nat Genet，2019，51（4）：600-605. DOI：10.1038/s41588-019-0350-x.

［12］XU Q，NI J J，HAN B X，et al. Causal relationship between gut microbiota and autoimmune diseases：a two-sample Mendelian randomization study［J］. Front Immunol，2021，12：746998. DOI：10.3389/fimmu.2021.746998.

［13］KURILSHIKOV A，MEDINA-GOMEZ C，BACIGALUPE R，et al. Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition［J］. Nat Genet，2021，53（2）：156-165. DOI：10.1038/s41588-020-00763-1.

［14］XIE J R，HUANG H K，LIU Z N，et al. The associations between modifiable risk factors and nonalcoholic fatty liver disease：a comprehensive Mendelian randomization study［J］. Hepatology，2023，77（3）：949-964. DOI：10.1002/hep.32728.

［15］STAIGER D，STOCK J H. Instrumental variables regression with weak instruments［J］. Econometrica，1997，65（3）：557. DOI：10.2307/2171753.

［16］BURGESS S，THOMPSON S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method［J］. Eur J Epidemiol，2017，32（5）：377-389. DOI：10.1007/s10654-017-0255-x.

［17］VERBANCK M，CHEN C Y，NEALE B，et al. Detection of widespread horizontal pleiotropy in causal relationships inferred from Mendelian randomization between complex traits and diseases［J］. Nat Genet，2018，50（5）：693-698. DOI：10.1038/s41588-018-0099-7.

［18］HEMANI G，ZHENG J，ELSWORTH B，et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome［J］. Elife，2018，7：e34408. DOI：10.7554/eLife.34408.

［19］STOREY J D，TIBSHIRANI R. Statistical significance for genomewide studies［J］. Proc Natl Acad Sci U S A，2003，100（16）：9440-9445. DOI：10.1073/pnas.1530509100.

［20］CHOI H，RAO M C，CHANG E B. Gut microbiota as a transducer of dietary cues to regulate host circadian rhythms and metabolism［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18（10）：679-689. DOI：10.1038/s41575-021-00452-2.

[21] TEICHMAN E M，O' RIORDAN K J，GAHAN C G M，et al. When rhythms meet the blues：circadian interactions with the microbiota-gut-brain axis［J］. Cell Metab，2020，31（3）：448-471. DOI：10.1016/j.cmet.2020.02.008.
[22] MARTIN C R，OSADCHIY V，KALANI A，et al. The brain-gut-microbiome axis［J］. Cell Mol Gastroenterol Hepatol，2018，6（2）：133-148. DOI：10.1016/j.jcmgh.2018.04.003.
[23] AIT-BELGNAOUI A，DURAND H，CARTIER C，et al. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats［J］. Psychoneuroendocrinology，2012，37（11）：1885-1895. DOI：10.1016/j.psyneuen.2012.03.024.
[24] STEIGER A. Sleep and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system［J］. Sleep Med Rev，2002，6（2）：125-138. DOI：10.1053/smrv.2001.0159.
[25] MEERLO P，SGOIFO A，SUCHECKI D. Restricted and disrupted sleep：effects on autonomic function，neuroendocrine stress systems and stress responsivity［J］. Sleep Med Rev，2008，12（3）：197-210. DOI：10.1016/j.smrv.2007.07.007.
[26] YUNES R A，POLUEKTOVA E U，DYACHKOVA M S，et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota［J］. Anaerobe，2016，42：197-204. DOI：10.1016/j.anaerobe.2016.10.011.
[27] AGUS A，PLANCHAIS J，SOKOL H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease［J］. Cell Host Microbe，2018，23（6）：716-724. DOI：10.1016/j.chom.2018.05.003.
[28] IMERI L，OPP M R. How（and why）the immune system makes us sleep［J］. Nat Rev Neurosci，2009，10（3）：199-210. DOI：10.1038/nrn2576.
[29] KRUEGER J M，OPP M R. Sleep and microbes［J］. Int Rev Neurobiol，2016，131：207-225. DOI：10.1016/bs.irn.2016.07.003.
[30] DALILE B，VAN OUDENHOVE L，VERVLIET B，et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2019，16（8）：461-478. DOI：10.1038/s41575-019-0157-3.
[31] BONAZ B，BAZIN T，PELLISSIER S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis［J］. Front Neurosci，2018，12：49. DOI：10.3389/fnins.2018.00049.
[32] BRAVO J A，FORSYTHE P，CHEW M V，et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve［J］. Proc Natl Acad Sci U S A，2011，108（38）：16050-16055. DOI：10.1073/pnas.1102999108.
[33] ZHOU J，WU X L，LI Z L，et al. Alterations in gut microbiota are correlated with serum metabolites in patients with insomnia disorder［J］. Front Cell Infect Microbiol，2022，12：722662. DOI：10.3389/fcimb.2022.722662.
[34] TAMANAI-SHACOORI Z，SMIDA I，BOUSARGHIN L，et al. Roseburia spp.：a marker of health?［J］. Future Microbiol，2017，12：157-170. DOI：10.2217/fmb-2016-0130.
[35] SZENTIRMAI É，MILLICAN N S，MASSIE A R，et al. Butyrate，a metabolite of intestinal bacteria，enhances sleep［J］. Sci Rep，2019，9（1）：7035. DOI：10.1038/s41598-019-43502-1.
[36] MOROTOMI M，NAGAI F，SAKON H，et al. Paraprevotella clara gen. nov.，sp. nov. and Paraprevotella xylaniphila sp. nov.，members of the family 'Prevotellaceae' isolated from human faeces［J］. Int J Syst Evol Microbiol，2009，59（Pt 8）：1895-1900. DOI：10.1099/ijs.0.008169-0.
[37] PATRA A K，YU Z T. Genomic insights into the distribution of peptidases and proteolytic capacity among Prevotella and Paraprevotella species［J］. Microbiol Spectr，2022，10（2）：e0218521. DOI：10.1128/spectrum.02185-21.
[38] ZHANG Q，YUN Y J，AN H M，et al. Gut microbiome composition associated with major depressive disorder and sleep quality［J］. Front Psychiatry，2021，12：645045. DOI：10.3389/fpsyt.2021.645045.
[39] ANDERSON J R，CARROLL I，AZCARATE-PERIL M A，et al. A preliminary examination of gut microbiota，sleep，and cognitive flexibility in healthy older adults［J］. Sleep Med，2017，38：104-107. DOI：10.1016/j.sleep.2017.07.018.

（收稿日期：2024-01-03；修回日期：2024-03-29）
（本文编辑：贾萌萌）